Protocol

siRNA再溶解プロトコール（チューブ用）

1. siRNAを含むチューブを短時間遠心し、siRNAペレットを底に集めます。

2. 表1に示した推奨容量の1×siRNA bufferを用いてsiRNAを再溶解しストック溶液を調製します。

注意）

① バッファー中の塩はRNAの吸光度（OD_{260}）の値を低くすることがあります。分光光度計を用いてsiRNAをより正確に定量するためには、siRNAを4容量の滅菌RNaseフリー水に再溶解して吸光度を測定し、その後に1容量の5×siRNA bufferを加えて最終的に1×濃度となるように調製します。

② siRNAは必ずRNaseフリーの溶液に再溶解してください。弊社の1×siRNA buffer（5×siRNA buffer（コード番号：B-002000-UB-100）より希釈）の使用をおすすめします。保存期間が短い場合はRNaseフリー水（RNase-free water、コード番号：B-003000-WB-100）を用いることができます。

③ 5×siRNA bufferを1×siRNA bufferに希釈するには、4容量の滅菌RNaseフリー水と1容量の5×siRNA bufferを混合します。1×siRNA bufferの組成は、60 mM KCl、6 mM HEPES pH 7.5、0.2 mM $MgCl_2$です。

④ 5×siRNA Bufferは、生理的な条件に近づくように最適化されていないため、*in vivo*の使用には向いていません。*in vivo*実験のためには、適切に緩衝化されたRNaseフリーの溶液を使用してsiRNAを再溶解してください。

表1. siRNAの再溶解用バッファー容量とストック溶液濃度

siRNA量（nmol）	目的の終濃度とするために加える再溶解バッファー（1×siRNA buffer）の液量（µl）	
	100 µM ストック溶液	20 µM ストック溶液
2.0	20	100
5.0	50	250
10	100	500
20	200	1,000
50	500	チューブ容量超過
100	1,000	

71-3726-31

3. ピペットを用いて溶液をチップに3～5回出し入れします。泡立てないように注意してください。

4. オービタルシェーカー（ミキサー）を使用して、溶液を室温で30分間混合します。

※この混合により、より確実にsiRNAを再溶解することができます。

5. siRNAを含むチューブを短時間遠心し、チューブの底に溶液が集まるようにします。

6. 分光光度計でsiRNAの濃度を測定します（260 nmにおける吸光度を測定）。

7. siRNA溶液を小分けし、−20℃あるいは−80℃にて保存します。最良のパフォーマンスを得るために、小分けしたチューブの凍結融解の回数は5回までにとどめてください。

技術的な考慮事項

- お使いの細胞株、トランスフェクション方法に適したなsiRNA濃度を決めるために、個々のsiRNAごとに実験条件の至適化を行ってください。

- siGENOME siRNAあるいはON-TARGET*plus* siRNAを効率的に細胞に導入するために、トランスフェクション試薬やエレクトロポレーションを提供するメーカーの取扱説明書の方法にしたがい、お使いの細胞株に適した導入条件を検討することをおすすめします。

- mRNAレベル、タンパク質レベル、表現型のアッセイにより、ノックダウン効果を評価することができます。RNAiはmRNAに特異的な現象のため、定量PCRやノーザン解析、QuantiGene branched DNA（Panomics社）などの方法を用い、mRNAレベルでの遺伝子発現抑制を確認することをおすすめします。脂質ベースのトランスフェクション試薬を用いた場合、ターゲット遺伝子のノックダウンが確認されるのは、mRNAレベルではトランスフェクション24～48時間後、タンパク質レベルでは48～96時間後です。Accell siRNAを導入した場合はトランスフェクション72時間後でノックダウンを確認します。ノックダウンを評価する最適な時間を決めるために、トランスフェクション後の時間を変えたタイムコース実験を行うことをおすすめします。

関連製品

- 5×siRNA buffer（コード番号：B-002000-UB-100）はdharmacon.gelifesciences.comで購入できます。
- DharmaFECTトランスフェクション試薬は、さまざまな細胞へ効率よくsiRNAを導入するために至適化されており4種類のラインナップがあります。
- 各種RNAi コントロール製品は、RNAi実験における理想的なコントロールとなります。
- Accell siRNAを使用する場合、Accell siRNA delivery media（コード番号：B-005000-100またはB-005000-500）が必要となります。

関連製品の詳細についてはdharmacon.gelifesciences.comをご覧ください。

補足資料

- DharmaFECTトランスフェクション試薬を使用した基本的なトランスフェクションプロトコールは弊社Webサイト（www.gelifesciences.co.jp/technologies/dharmacon/index.html）からダウンロードできます。

よくある質問（FAQ）

質問	回答
再溶解したsiRNAはどのように定量したらよいでしょうか?	siRNAを滅菌RNaseフリー水に再溶解し、分光光度計を用いて260 nmにおける吸光度（A_{260}）を測定することにより、RNAを定量することができます。
siRNA溶液の濃度はどのように計算したらよいでしょうか?	Lambert-Beerの法則：吸光度（260 nm）＝εxモル濃度（M）x光路長（cm）より、RNA溶液の濃度は次のように求められます。 モル濃度（M）＝吸光度（260 nm）／（εx光路長（cm）） （ε：モル吸光係数は製品添付のProduct Transfer Formに記載があります）
再溶解したRNA量の計算値と、製品仕様書に記載の値が異なるのはなぜでしょうか?	• バッファー中の塩はRNAの吸光度（OD_{260}）の値を低くすることがあります。分光光度計を用いてsiRNAをより正確に定量するためには、プロトコールのステップ2にあるように、siRNAを滅菌RNaseフリー水に再溶解して吸光度を測定してください。 • RNAを定量する装置により測定値が異なることがあります。 • siRNA溶液の濃度が高すぎる可能性があります。吸光度は0.15から0.6の間で、標準曲線が直線的な領域にある値が正確です。 • siRNA溶液の濃度が低すぎる可能性があります。小容量（1～1.5 µl）の溶液を希釈して定量する場合、ばらつきが大きくなりやすくなります。 • siRNAが十分に再溶解されていない可能性があります。凍結乾燥によりRNAは凝集体や高次構造体を形成することがあります。それらを破壊するには、RNAを95℃にて1～3分加温後、ゆっくりと30～45分かけて冷却し相補鎖同士を再アニールさせます。
届いた凍結乾燥状態のsiRNAサンプルを室温にて1週間置いておきました。siRNAはまだ使えますか?	はい、使えます。siRNAは乾燥ペレットとして出荷され、室温にて2～4週間安定です（室温輸送／冷凍保存）。お受け取りになりましたら、siRNAは−20℃、あるいは−70℃から−80℃にて保存してください。
siRNAの平均分子量は?	平均分子量は13,300 g/molです。
siRNAの量をnmol単位からµg単位に、あるいはその逆に変換するにはどうしたらよいでしょうか?	siRNA製品に添付のProduct Transfer Formに記載の分子量を使用して変換してください。分子量が分からない場合には、siRNAの平均分子量（13,300 g/mol）を使用することができます。例えば、5 nmolのsiRNAについては、以下のような変換になります。 （5 nmol）（13,300 g/mol）（mol/109 nmol）（106 µg/g）= 66.5 µg

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL：03-5331-9336　FAX：03-5331-9370
e-mail：Tech-JP@ge.com

Intertek
ISO 9001:2008
認証取得

©2015 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。